

## APPLICATION SHEET

# 『抗オボアルブミン抗体とその抗原との相互作用』

九州計測器株式会社 ケミカルセンシンググループ

[http://www.qk-net.co.jp/RANA\\_Site/top-r.html](http://www.qk-net.co.jp/RANA_Site/top-r.html)

【本社】福岡県福岡市博多区山王一丁目 6-18

TEL:092-441-3200 FAX:092-441-3264

### 1. はじめに

表面プラズモン共鳴センサは分子間の相互作用の検討に用いることができる。センサ表面にアフィニティ精製した抗オボアルブミン抗体を固定化し、オボアルブミンをアナライトとしてインジェクトし固定化した抗体との相互作用の測定例について、センサ表面作製法および測定方法を紹介する。

### 2. 実験方法

#### 2.1 試薬など

- NHS : 115 mg の N-hydroxysuccinimide を 10 mL の蒸留水で溶解する。要時調製だが、小分けして-30℃で凍結保存が可能。
- ECD : 750 mg の N-ethyl-N'- (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride を 10 mL の蒸留水で溶解する。要時調製だが、小分けして-30℃で凍結保存が可能。
- Ethanolamine : ethanolamine hydrochloride を NaOH で pH 8.5 に調整し、蒸留水でフイルアップし濃度を 1 M にしたもの。
- 抗オボアルブミン抗体 : Biolegend inc.社のマウスモノクローナル抗体 No.520401 を使用した。アフィニティ精製品で、Isotype は IgG2a。
- Buffer A : 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.005% Tween20
- Buffer B : 10 mM 酢酸 buffer, pH 5.0

#### 2.2 センサ表面の作製

##### 2.2.1 センサチップの洗浄と自己組織化単分子膜の形成

- ①チップをイソプロピルアルコール (5 min)、メタノール (5 min) の順に超音波洗浄し、蒸留水でリンスして乾燥。
- ②自己組織化単分子膜形成用 PDMS を 1.35 M HCl で 5 min 超音波洗浄し、蒸留水でリンスして乾燥。
- ③PDMS をチップに装着しエタノールに溶解した 1 mM 7-carboxy-1-heptanethiol (同仁化学研究所) を投入し、カバーガラスで蓋をして密封容器に入れ室温でオーバーナイト。
- ④チップを蒸留水でリンスして、エタノールに浸漬して 30 s 超音波洗浄し、蒸留水でリンスして乾燥。

スして乾燥。アネロパック（脱酸素剤：三菱ガス化学）とともに密封し、使用まで4℃で保存しておく。

### 2.2.2 チップ表面への抗オボアルブミン抗体の固定化

- ①チップに 5ch フローセル（PDMS 製）と 5ch インジェクションプレートをセットし、各チャンネルに Buffer A を 20  $\mu$ L インジェクト<sup>注1)</sup>し、センサグラムが安定するまで待つ。
- ②NHS と ECD を等量混合したものを ch3 と ch4 にそれぞれ 20  $\mu$ L インジェクトして 10min 保持。
- ④ch4 に Buffer B に溶解した 100  $\mu$ g/mL の抗オボアルブミン抗体を、ch3 に Buffer B をそれぞれ 20  $\mu$ L インジェクトし<sup>注2)</sup>、10min 保持。
- ⑤20  $\mu$ L の Buffer A を 2 回インジェクト。
- ⑥20  $\mu$ L の Ethanolamine を 2 回インジェクト。10min 保持。
- ⑦20  $\mu$ L の Buffer A を 2 回インジェクト。

注 1) 必要に応じてインジェクションプレートの液溜の溶液を取り除いた。

注 2) 目的のタンパク質を固定化した ch と何も固定化しないリファレンス用の ch を作成する必要がある。

### 2.3 相互作用の測定

- ①SPR センサを起動し温度が安定するまで静置。
- ②調製した試薬類を室温にしておく。
- ③抗オボアルブミン抗体を固定したチップをセンサにセットし、Cross1 フローセルと Cross1 インジェクションプレートをセットする。
- ④Buffer A を 60  $\mu$ L インジェクトし、測定開始。3 min 保持して、0 点調整を行う。
- ⑤Buffer A で所定濃度に希釈したオボアルブミン（和光純薬）を 60  $\mu$ L インジェクトし 3 min 保持。
- ⑥60  $\mu$ L の Buffer A を 2 回インジェクト。
- ⑦60  $\mu$ L の 100 mM HCl を 2 回インジェクト。
- ⑧60  $\mu$ L の Buffer A を 2 回インジェクトして 3 min 保持。
- ⑨オボアルブミンの濃度を変えて④から繰り返す。

## 3. 結果

チップ表面への抗オボアルブミン抗体の固定化を図 1 に示した。矢印 3 で Buffer B に溶解した 100  $\mu$ g/mL の抗オボアルブミン抗体をインジェクトすると急激にシグナルが増加し、抗オボアルブミン抗体が固定化されていることが分かる。その後エタノールアミンで未反応の NHS エステルをブロッキングし、最終的に約 2500 RU の固定化量を得た。

次に固定化抗体と遊離オボアルブミンとの相互作用を図 2 に示した。オボアルブミンと

その抗体とのオボアルブミン濃度に応じた結合と、100 mM HCl による解離が観察された。

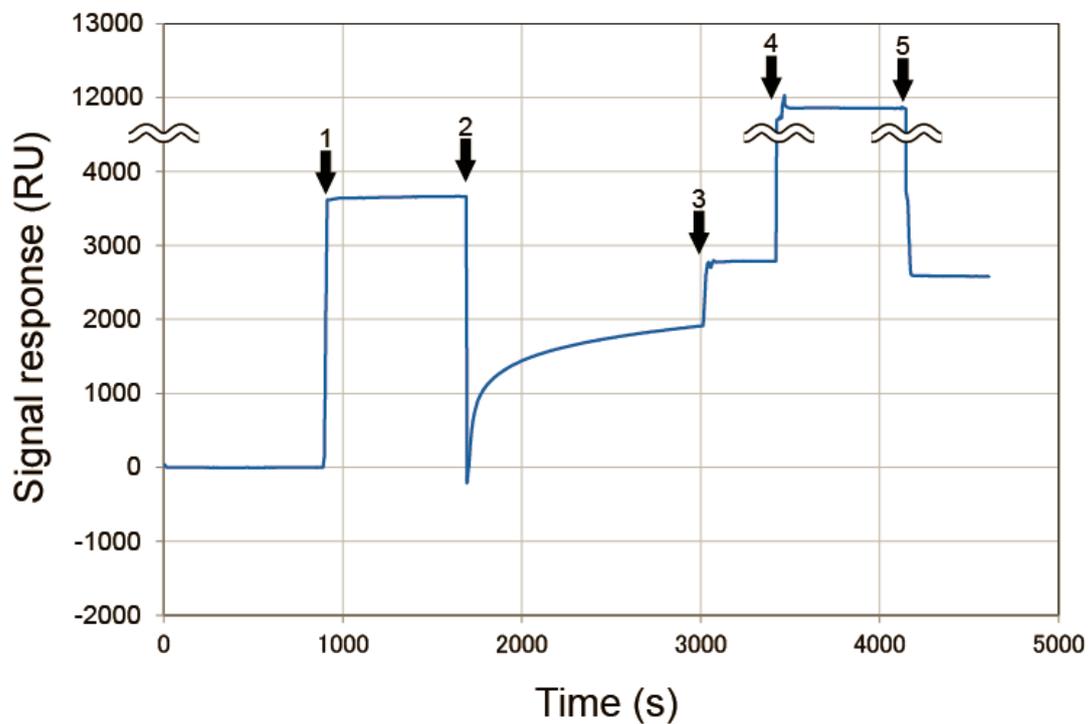


図1 チップ表面への抗オボアルブミン抗体の固定化

矢印は次の溶液のインジェクトを示している。1 : NHS/ECD 混合液、2 : Buffer B に溶解した 100  $\mu$ g/mL の抗オボアルブミン抗体、3 : Buffer A、4 : Ethanolamine、5 : Buffer A。Signal response は RU 値で表示した。1 RU は 1/10000 度の共鳴角変化を示す。

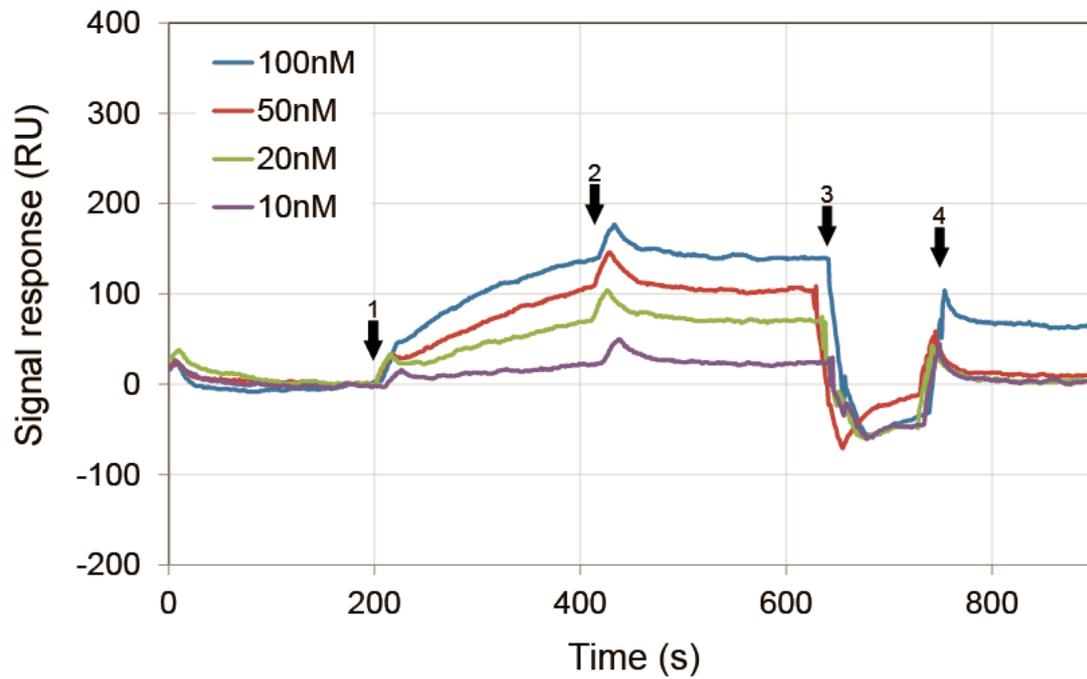


図2 固定化抗オボアルブミン抗体とオボアルブミンとの相互作用

矢印は次の溶液のインジェクトを示している。1: Buffer A で希釈したオボアルブミン、2: Buffer A、3: 100 mM HCl、4: Buffer A。それぞれの Signal response は抗オボアルブミン抗体を固定した ch3 の応答から何も固定していない ch4 の応答を減算したものの。